



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 195 23 269 A 1

⑳ Aktenzeichen: 195 23 269.0  
㉑ Anmeldetag: 29. 8. 85  
㉒ Offenlegungstag: 28. 11. 88

⑤ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
C 12 N 15/60  
C 12 N 9/88  
C 12 P 7/28  
C 07 C 49/245  
C 07 C 45/72  
// (C12N 15/60, C12R  
1:01) C07C 47/08,  
47/54

DE 195 23 269 A 1

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①  
28.05.95 DE 195188098

⑦① Anmelder:  
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

⑦② Erfinder:  
Bruhn, Helke, Dr., 50733 Köln, DE; Pohl, Martina, Dr.,  
52084 Aachen, DE; Mesch, Kathrin, 45481 Mülheim,  
DE; Kula, Maria-Regina, Prof., 52383 Niederzier, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
DE 5 48 459

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur Gewinnung von Acyloinen, dafür geeignete Pyruvat-decarboxylase sowie deren Herstellung und DNA-Sequenz des für dieses kodierenden PDC-Gens

⑤⑦ Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Gewinnung einer Pyruvat-decarboxylase durch Isolierung aus einem Produzenten-Organismus. Die Pyruvat-decarboxylase ist zur Bildung von (R)-(-)-Phenylacetylcarbinol (I) in  $\geq 85\%$  Enantiomerenreinheit mit einem Produktverhältnis von I zu 2-Hydroxypropioiophenon von  $\geq 85\%$  befähigt. Außerdem besitzt die Pyruvat-decarboxylase eine spezifische Aktivität bezüglich der Phenylacetylcarbinolbildung von  $\geq 10/\text{mg}$ . Ziel der Erfindung ist, eine Pyruvat-decarboxylase mit verbesserter Synthesekapazität bezüglich der Bildung von (R)-(-)-Phenylacetylcarbinol zu erhalten. Das zu diesem Zweck entwickelte erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß man einen Produzenten-Organismus mit einem für Pyruvat-decarboxylase kodierenden Gen aus *Zymomonas mobilis* verwendet, in dessen DNA-Sequenz das für den Tryptophanrest kodierende Kodon TGG an der Position 1174-1178 durch ein Kodon ersetzt ist, das für einen Aminosäurerest mit verminderter Raumerfüllung kodiert.

DE 195 23 269 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 88 802 048/428

8/28

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Gewinnung von Acyloinen durch enzymatische Umwandlung von  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren und/oder Aldehyden in Gegenwart von Pyruvat-decarboxylase (PDC) und sie umfaßt eine dafür geeignete PDC sowie deren Herstellung und das für diese kodierende Gen.

Acyloine bzw.  $\alpha$ -Hydroxyketone sind Verbindungen mit einem optisch aktiven C-Atom, die in der Synthese von komplexeren Verbindungen eine erhebliche Rolle spielen, wie insbesondere das (R)-(-)-Phenylacetylcarbinol (PAC), das für die Produktion von Ephedrin wirtschaftlich von großem Interesse ist. Hier interessiert das R-Enantiomere, das durch fermentative Umwandlung von Pyruvat in Gegenwart von Benzaldehyd mittels *Saccharomyces cerevisiae* gebildet wird (DE-PS 5 48 459 von 1932).

Bei dieser Synthese von PAC mittels Hefezellen werden auf Grund der Mehrzahl von in der Hefe vorhandenen Enzymen zahlreiche Nebenprodukte gebildet, und das Zellwachstum wird durch die Anwesenheit von Benzaldehyd inhibiert.

Auch die aus der Hefe isolierte Pyruvat-decarboxylase (PDC) führt bei dieser Umsetzung zu erheblichen Anteilen des zu PAC isomeren 2-Hydroxypropioiphenons.

Die thiamindiphosphat- und  $Mg^{2+}$ -abhängige PDC (E.C. 4.1.1.1) ist weit verbreitet und wird in vielen Pflanzen, Hefen und Pilzen und in einigen Bakterien gefunden. Sie katalysiert die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und als Nebenreaktion erfolgt eine Acyloinkondensation unter Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen, wie aus Fig. 1 ersichtlich ist.

Eine solche enzymatische Umsetzung erfolgt auch ausgehend von einem Aldehyd an Stelle von  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren, und an der Kondensationsreaktion kann auch der durch die Decarboxylierung gebildete Aldehyd als "Cosubstrat" unter Bildung von Homocyloinen  $R-CHOH-CO-R'$  mit  $R = R'$  teilnehmen.

Isoliert wurde auch bereits die PDC aus *Zymomonas mobilis*.

Ein Vergleich einer aus Hefe isolierten PDC mit PDC aus *Zymomonas mobilis* bzgl. der Bildung von PAC unter vergleichbaren Bedingungen zeigte jedoch eine deutlich geringere Synthesekapazität der PDC aus *Zymomonas mobilis* (S. Bringer-Meyer u. H. Sahm, *Biocatalysis* 1 (1988) S. 321—331).

Es wurde nun überraschend festgestellt, daß durch gezielte gentechnologische Abwandlung des PDC-Gens von *Z. mobilis* eine PDC mit verbesserter Synthesekapazität bzgl. der Bildung von PAC erhalten werden kann, die sich zudem durch eine hohe Selektivität zur Bildung von PAC im Vergleich zu 2-Hydroxypropioiphenon auszeichnet.

Das erfindungsgemäße Verfahren der eingangs genannten Art ist im wesentlichen dadurch gekennzeichnet, daß man als PDC ein Enzym verwendet, bei dem der Tryptophanrest im zum aktiven Zentrum hinführenden Substratkanal durch einen sterisch kleineren Aminosäurerest ersetzt ist.

Bei einem sterisch kleineren Aminosäurerest handelt es sich insbesondere um eine einfache, insbesondere aliphatische Aminosäure, wie speziell Alanin, Glycin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Arginin oder Histidin, oder auch Serin und Threonin.

Man erhält die gentechnologisch abgewandelte neue PDC durch Austausch des für Tryptophan an der Stelle 392 kodierenden Kodons TGG in der Position 1174—1176 der DNA-Sequenz des PDC-Gens aus *Z. mobilis* in an sich bekannter Weise und Expression der PDC in einem Produzenten-Organismus, wie insbesondere *E. coli*, aus dem die PDC isoliert wird. Die gezielte Mutation erfolgt z. B. mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der auf Seite 4 angegebenen Primer. Die Konstruktion des Expressionsvektors pBTac2 für die mutierte PDC wurde ausgehend vom *E. coli*-Expressionsvektor pPDC des Wildtypenzym durchgeföhrt.

Die Gewinnung der mutierten PDC erfolgt nach Ernte und Aufschluß der Zellen aus dem Rohextrakt in an sich bekannter Weise durch chromatographische Methoden.

Durch die erfindungsgemäße Abwandlung der PDC wird ihre PAC-Synthesekapazität um den Faktor 4 verbessert. Diese Verbesserung resultiert aus der gezielten Abschwächung bzw. Beseitigung der Zugangslimitierung im zum aktiven Zentrum des Enzyms hinführenden Substratkanal, wodurch der Zugang voluminöser Substratmoleküle zum aktiven Zentrum und der Abgang des gebildeten Produkts erleichtert wird.

Eine analoge Optimierung ist generell bei thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen zu erreichen, die eine Zugangslimitierung — sei es sterischer oder durch Ladungseinflüsse bedingter Art — im zum aktiven Zentrum führenden Substratkanal aufweisen: Durch analoge Abwandlung der DNA-Sequenz des für das Enzym kodierenden Gens, und zwar durch Austausch des für die Zugangslimitierung kodierenden Kodons durch ein Kodon, das für einen die Zugangslimitierung beseitigenden Aminosäurerest kodiert, erreicht man eine deutliche Steigerung der Synthesekapazität des Enzyms.

Die gemäß der den Ausgangspunkt der Erfindung bildenden Zielsetzung so erhaltene PDC ist für die PAC-Synthese von erheblichem Interesse, da mit ihr eine hohe optische Reinheit des R-(-)-Isomeren (>98%) und ein PAC erhalten werden kann, das nur zu wenigen Prozenten (2—3%) von 2-Hydroxy-propioiphenon begleitet wird. Die Gewinnung und Isolierung des Enzyms aus dem geernteten Mikroorganismus ist auf relativ einfache Weise (im Vergleich zu Hefe) möglich.

Bei der enzymatischen Acyloinkondensation mittels PDC können als Substrat lineare und/oder verzweigte  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren und als Substrat und/oder Cosubstrat aromatische, cyclische, längerkettige und/oder verzweigte Aldehyde eingesetzt werden. Als Beispiel können hier Benzaldehyd, Cyclohexanaldehyd, Furfurol, Zimtaldehyd, Krotonaldehyd, Pyruvat, 2-Ketobuttersäure, 2-Ketopentansäure, 2-Keto-4-methylhexansäure, 2-Keto-4-methylpentansäure, 2-Keto-4,4-dimethylhexansäure, 3-Phenyl-Z-keto-propansäure genannt werden.

Weitere Besonderheiten der Erfindung ergeben sich aus den Patentansprüchen und der nachfolgenden Beschreibung von Ausführungsdetails. Dabei wird Bezug genommen auf die angefügten Zeichnungen; es sind im einzelnen:

Fig. 1 Das Reaktionsschema der PDC für das Beispiel Pyruvat und Benzaldehyd als Substrat und Cosubstrat

mit dem Hauptweg der Decarboxylierung und der Carboligase-Nebenreaktion mit der Bildung von PAC;

Fig. 2 Ein Konstruktionsschema für die Bildung des die PDC aus *Z. mobilis* enthaltenden Expressionsvektors pPDC und

Fig. 3 Ein Schema für eine durch Abfangen von Acetaldehyd mittels Alkoholdehydrogenase optimierte Produktion von PAC gemäß Fig. 1.

5

### Beispiel

#### 1. Herstellung der PDC-Mutante PDC-W392A

10

##### 1.1 Konstruktion des Expressionsvektors pPDC

Für die Expression der PDC aus *Zymomonas mobilis* wurde der Vektor pBTac2 (Boehringer, Mannheim) gewählt. Die Transkription des Fremdgens steht unter der Kontrolle des starken tac-Promotors, einem Hybrid aus trp- und lacUV-Promotor mit der 11-fachen bzw. 3-fachen Effizienz der parental Promotoren. Die Operatorsequenz und Ribosomenbindungsregion entstammen dem lacZ-Gen. Die Regulation der Transkription erfolgt somit durch den lac-Repressor eines überexprimierenden (lacI<sup>Q</sup>) Bakterienstammes und ist durch Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) induzierbar. Der Vektor enthält eine einzelne Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease EcoRI, gefolgt von dem Initiationscodon ATU und anschließend weiteren Restriktionserkennungssequenzen (sites), so daß dieser Vektor universell zur Expression sowohl für Gensequenzen mit als auch ohne eigenem Initiationskodon eingesetzt werden kann.

Der multiplen Klonierungsstelle folgen die starken ribosomalen RNA Transkriptionsterminatoren rrnB, um den kontrollierten Abbruch der Transkription zu gewährleisten. Als Ausgangsmaterial zur Klonierung des PDC-Gens aus *Zymomonas mobilis* (ATCC 29191) stand der Vektor pZY134B (G. Sprenger, Inst. f. Biotechnologie 2, KFA-Jülich) zur Verfügung. Dieses Plasmid beinhaltet ein 3,2 kb großes DNA-Fragment aus *Zymomonas mobilis* mit dem vollständigen PDC-Gen inklusive nichtkodierender Regionen (Fig. 2). Um eine Ligation der kodierenden Sequenz in den Expressionsvektor zu ermöglichen, war es erforderlich, in 5'-Richtung des Initiationskodons eine neue Restriktionserkennungssequenz einzuführen. Den optimalen Abstand des Initiationskodons von der Shine-Dalgarno-Sequenz des Vektors gewährleistet die Ligation des Gens in die EcoRI-site des pBTac2-Vektors. Eine elegante und einfache Methode, eine DNA-Sequenz zu modifizieren, bietet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstrangs und enzymatische Synthese durch eine thermostabile DNA-Polymerase ermöglichen die exponentielle Amplifizierung definierter DNA-Fragmente. Die Größe und Identität der Produkte wird durch die Startpunkte (Primer) der Synthese bedingt. Enthalten die Primer eine Modifikation der ursprünglichen Sequenz, etwa Mutationen, Deletionen oder auch zusätzliche Basen (Insertionen), werden diese folglich auch im synthetischen Fragment vorhanden sein.

Mit dieser Methode wurde die benötigte EcoRI-Restriktionssite in 5'-Richtung des Initiationskodons des PDC Gens eingeführt, indem während der Oligonukleotidsynthese am 5'-Ende des zum Gen komplementären Primers die Erkennungssequenz des Enzyms angeschlossen wurde. Da einige Endonukleasen eine stark verminderte Aktivität für die Restriktion endständiger Sequenzen zeigen, wurden vier weitere Basen stromaufwärts an die EcoRI-site angefügt.

Die zur PCR meist verwendete Taq-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (proof-reading). Die von ihr synthetisierte Sequenz ist folglich mit einer statistischen Fehlerrate behaftet. Auch wenn diese durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen mit 1/100.000 sehr gering gehalten werden kann, bedingt dies die Notwendigkeit der Sequenzierung eines jeden Fragments, um die Integrität der Synthese sicherzustellen. Daher wurde nicht die gesamte kodierende Region des PDC-Gens (1712 bp), sondern ein kleineres Fragment (890 bp) vom 5'-Terminus bis zu einer einzelnen Restriktionssite (EcoRV) zur Amplifikation gewählt (Fig. 2).

Das PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen EcoRI und EcoRV verdaut.

Der fehlende zweite Teil des PDC-Gens wurde durch Restriktion mit EcoRV und BamHI aus dem Plasmid pZV134B gewonnen, wobei das so entstehende Fragment (1,2 kb) am 3'-Ende noch ca. 350 bp nicht-translatierte Sequenz des PDC-Gens enthält. Beide Fragmente wurden durch präparative Agarosegelelektrophorese separiert, isoliert und in den EcoRI und BamHI linearisierten, isolierten pBTac2 (4,6 kb) ligiert. Die Klonierung erfolgte in *E. coli* JM 109, einem den lac-Repressor überexprimierenden Stamm.

#### 1.2 Molekularbiologische Arbeiten

55

Für die Gewinnung einer durch Tryptophan/Alanin-Austausch mutierten PDC an der Position 392 wurde zunächst das beim Wildtyp-Enzym vorhandene Kodon TGG (Tryptophan) gegen GCG (Alanin) ausgetauscht (Austausch der Position 1174–1176 des Gens der Pyruvat-decarboxylase aus *Zymomonas mobilis*). Die Einführung der gezielten Mutationen erfolgte mit Hilfe der von Ho et al. beschriebenen Polymerasekettenreaktion gestützten Methode (S. N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, *Gene* 77 (1989) S. 51).

Als Ausgangspunkt stand das PDC-Gen aus *Z. mobilis* im *E. coli*-Expressionsvektor pPDC zur Verfügung (s. Fig. 2). Die DNA-Isolierung erfolgte nach Standardmethoden (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning* (1989) Spring Harbor Laboratory Press).

Als Templat zur Synthese der beiden überlappenden Einzelfragmente diente das Plasmid pPDC. Die Primer (Primersequenzen gemäß Anhang) wurden mit einer Konzentration von 0,2–0,4 nM eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Taq-Polymerase (Biomasters, Köln) im vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer, zuzüglich 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und je 0,2 mM der Nukleotide im "Robo-Cycler" (Stratgene) mit folgendem Temperaturprogramm

durchgeführt: 25 Minuten bei 94°C zur Denaturierung, anschließend 30 Zyklen mit einer 15-minütigen Denaturierung bei 94°C, 1,5 Minuten Annealing bei 48°C und 2 Minuten Extension bei 72°C, gefolgt von 10 Minuten bei 72°C zur Vervollständigung der Reaktion. Die Annealing-Temperatur variierte zwischen 48°C und 56°C, je nach theoretischem Schmelzpunkt der verwendeten Primer. Der Schmelzpunkt der Oligonukleotide wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$T_m = 2 \cdot (A+T) + 3 \cdot (C+G)$$

Die Fragmente wurden elektrophoretisch separiert, isoliert, zur Konzentrierung mit Ethanol präzipitiert und in Tris-HCl-Puffer, 10 mM, pH 7,4, wieder aufgenommen.

In der zweiten kombinierten PCR wurden je ca. 50–100 ng der überlappenden Fragmente als Template eingesetzt. Die weiteren Reaktionsbedingungen waren identisch zur ersten Reaktion. Die Wahl der Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der resultierenden Überlappingsregion der Fragmente. Die weiteren Manipulationen (Restriktion, Isolierung, Ligation) zum Ersatz der Wildtyp-DNA im Expressionsvektor pPDC durch die mutierten Fragmente erfolgten nach Standardmethoden (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning (1989) Spring Harbor Laboratory Press).

#### Sequenzen der verwendeten Primer

Die Numerierung bezieht sich auf das 1. (5')-Nukleotid der PDC-Sequenz s = sense, as = anti-sense. Die mutierten Basen sind unterstrichen.  
Primer zur Synthese des 5'-Einzelfragmentes

#### • PDC867s

CTACTCCACCACTGGTTGGACG

#### • PDC1186as

GAGCATTGAACGCCAGAGTCACC

Primer zur Synthese des 3'-Einzelfragmentes

#### • PDC1159s

GAAACCGGTGACTCTGCGTTCAATGC

#### • PBTAC4534as

ATCTTCTCTCATCCGCCAAAACA

(dieser Primer ist komplementär zur Vektorsequenz am 3'-Ende anschließend an die PDC-Sequenz)  
Primer zur Synthese des Fusionsfragmentes

#### • PDC867s

CTACTCCACCACTGGTTGGACG

#### • PBTAC4534as

ATCTTCTCTCATCCGCCAAAACA

(dieser Primer ist komplementär zur Vektorsequenz am 3'-Ende anschließend an die PDC-Sequenz)

ATGAGTTATA	CTGTCCGTAC	CTATTTAGCG	GAGCGGCTTG	TCCAGATTGG	
TCTCAAGCAT	CACTTCGCAG	TCGCGGGCGA	CTACAACCTC	GTCCTTCTTG	5
ACAACCTGCT	TTTGAACAAA	AACATGGAGC	AGGTTTATTG	CTGTAACGAA	
CTGAACTGCG	GTTTCAGTGC	AGAAGGTTAT	GCTCGTGCCA	AAGGCGCAGC	
AGCAGCCGTC	GTTACCTACA	GCGTTGGTGC	GCTTTCCGCA	TTTGATGCTA	10
TCGGTGGCGC	CTATGCAGAA	AACCTTCCGG	TTATCCTGAT	CTCCGGTGCT	
CCGAACAACA	ACGACCACGC	TGCTGGTCAT	GTGTTGCATC	ACGCTCTTGG	
CAAAACCGAC	TATCACTATC	AGTTGGAAAT	GGCCAAGAAC	ATCACGGCCG	15
CCGCTGAAGC	GATTTACACC	CCGGAAGAAG	CTCCGGCTAA	AATCGATCAC	
GTGATCAAAA	CTGCTCTTCG	CGAGAAGAAG	CCGGTTTATC	TCGAAATCGC	
TTGCAACATT	GCTTCCATGC	CCTGCGCCGC	TCCTGGACCG	GCAAGTGCAT	20
TGTTCAATGA	CGAAGCCAGC	GACGAAGCAT	CCTTGAATGC	AGCGGTTGAC	
GAAACCCTGA	AATTCATCGC	CAACCGCGAC	AAAGTTGCCG	TCCTCGTCCG	
CAGCAAGCTG	CGCGCTGCTG	GTGCTGAAGA	AGCTGCTGTT	AAATTCACCG	25
ACGCTTTGGG	CGGTGCAGTG	GCTACTATGG	CTGCTGCCAA	GAGCTTCTTC	
CCAGAAGAAA	ATGCCAATTA	CATTGGTACC	TCATGGGGCG	AAGTCAGCTA	
TCCGGGCGTT	GAAAAGACGA	TGAAAGAAGC	CGATGCGGTT	ATCGCTCTGG	30
CTCCTGTCTT	CAACGACTAC	TCCACCACTG	GTTGGACGGA	TATCCCTGAT	
CCTAAGAAAC	TGGTTCTCGC	TGAACCGCGT	TCTGTCGTTG	TCAACGGCAT	
TCGCTTCCCC	AGCGTTCATC	TGAAAGACTA	TCTGACCCGT	TTGGCTCAGA	35
AAGTTTCCAA	GAAAACCGGT	TCTTTGGACT	TCTTCAAATC	CCTCAATGCA	
GGTGAACCTGA	AGAAAGCCGC	TCCGGCTGAT	CCGAGTGCTC	CGTTGGTCAA	
CGCAGAAATC	GCCCCTCAGG	TCGAAGCTCT	TCTGACCCCG	AACACGACGG	40
TTATTGCTGA	AACCGGTGAC	TCTTGGTTCA	ATGCTCAGCG	CATGAAGCTC	
CCGAACGGTG	CTCGCGTTGA	ATATGAAATG	CAGTGGGGTC	ACATTGGTTG	
GTCCGTTTCT	GCCGCCTTCG	GTTATGCCGT	CGGTGCTCCG	GAACGTCGCA	45
ACATCCTCAT	GGTTGGTGAT	GGTTCCTTCC	AGCTGACGGC	TCAGGAAGTT	
GCTCAGATGG	TTGCGCTGAA	ACTGCCGGTT	ATCATCTTCT	TGATCAATAA	50
CTATGGTTAC	ACCATCGAAG	TTATGATCCA	TGATGGTCCG	TACAACAACA	
TCAAGAACTG	GGATTATGCC	GGTCTGATGG	AAGTGTTCAA	CGGTAACGGT	
GGTTATGACA	GCGGTGCTGC	TAAAGGCCTG	AAGGCTAAAA	CCGGTGGCGA	
ACTGGCAGAA	GCTATCAAGG	TTGCTCTGGC	AAACACCGAC	GGCCCAACCC	55
TGATCGAATG	CTTCATCGGT	CGTGAAGACT	GCACTGAAGA	ATTGGTCAAA	
TGGGGTAAGC	GCGTTGCTGC	CGCCAACAGC	CGTAAGCCTG	TTAACAAGCT	60
CCTCTAG					

## 1.2 Expression und Reinigung

Durch Expression der modifizierten DNA in *E. coli*-Zellen wurde ein erfindungsgemäßes Enzym (PDC-W392A) erhalten. Das mutierte Enzym (Mutante) PDC-W392A wurde gemäß folgender Prozedur exprimiert und aus dem Zellextrakt aufgereinigt:

Die das Expressionsvektor für die Mutante PDC-W392A tragenden *E. coli*-Zellen wurden in IB-Medium inklusive 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion fermentiert. Das Medium wurde mit Vorkulturen in der stationären Wachstumsphase im Verhältnis 1 : 50 angeimpft und bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die PDC-Mutante wurde unter diesen Bedingungen mit 20% des löslichen Proteins in *E. coli* überexpressiert.

Zur Produktion ausreichender Enzymmengen wurde die Expression wie oben beschrieben im 8-Liter-Fermenter durchgeführt. Es wurde ein pH-Wert von 7,0 sowie ein Luftstrom von 10 l/h eingestellt. Die Rührgeschwindigkeit betrug 200 rpm. Zur Vermeidung überschüssiger Schaumbildung wurde nach Bedarf Polypropylen glycol zugesetzt. Die Zellen wurden nach 3-stündiger Expression durch gekühlte kontinuierliche Zentrifugation geerntet.

Der Aufschluß erfolgte durch Vermahlen mit Glasperlen. Hierzu wurde eine 30%ige Zellsuspension in Mes/KOH-Puffer, 50 mM, pH 6,5, inklusive 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 mM ThDP hergestellt und mit einem doppelten Volumen an Glasperlen (d = 0,3 mm) versetzt. Abhängig vom zu bearbeitenden Volumen wurde der Aufschluß in Eppendorfgefäßen in einer Retsch-Mühle oder eisgekühlt im Disintegrator S (Maximalvolumen 80 ml) durchgeführt. Die Vermahlung erfolgte über 10 Minuten mit maximaler Leistung. Die Suspension wurde zentrifugiert, die Glasperlen mit Puffer gewaschen und die vereinigten Zentrifugate filtriert (1 µm). Die Aufreinigung der PDC-Mutanten erfolgte säulenchromatographisch wie folgt:

#### 1. Anionenaustauschchromatographie

Der Rohextrakt (ca. 110 ml, ca. 1,0–1,5 g Protein) wurde auf eine Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) (2,6 × 9,5 cm) mit einer Flußrate von 5 ml/min unter Verwendung einer FPLC-Anlage der Fa. Pharmacia. Das Enzym eluierte durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten (von 0–200 mM) in 10 mM Mes/KOH, pH 6,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ThDP, bei 100 mM NaCl.

Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden durch Aktivitätstest (s. unten) identifiziert.

#### 2. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die vereinigten Fraktionen wurden auf einen Ammoniumsulfatgehalt von 50%-Sättigung durch Zugabe eines Volumens gesättigter Ammoniumsulfatlösung eingestellt. Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde an Butyl-Sepharose (Pharmacia) (Säule: 5 × 8 cm) mit einer Flußrate von 2 ml/min durchgeführt. Das Material wurde vor dem Beladen mit 40% Ammoniumsulfat in 50 mM Mes/KOH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ThDP äquilibriert. Das Enzym eluierte im selben Puffer mit einem fallenden Ammoniumsulfatgradienten (40–0%) bei 24%. Die Zielfraktionen wurden wiederum mittels Aktivitätstest identifiziert und vereinigt (ca. 160 ml).

3. Entsalzung über Sephadex G25 und Umpuffern auf 50 mM Mes/KOH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ThDP. Die Flußrate betrug 20 ml/min. Anschließend wurde lyophilisiert.

#### 1.3. Aktivitätstest (Decarboxylierungsreaktion)

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde im gekoppelten enzymatischen Test durchgeführt, wobei photometrisch die NADH-Oxidation durch das Hilfsenzym Alkohol-dehydrogenase aus Hefe (E.C. 1.1.1.1) verfolgt wird. Der Reaktionsansatz enthielt 16,9 mM Pyruvat, 0,18 mM NADH und 10 U ADH in 50 mM Mes/KOH, pH 6,5, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,5 mM ThDP. Eine Enzymeinheit PDC (1 U) entspricht der Enzymmenge, die die Umsetzung von 1 µmol Substrat in einer Minute bei 30°C katalysiert. Die Enzymaktivität berechnet sich nach:

$$c \text{ (U/ml)} = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V}{s \cdot d \cdot v} \cdot f$$

$$s(\text{NADH}) = 6,31 \cdot \text{mMol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

V = Gesamtvolumen

v = Probenvolumen

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ΔE/min = Extinktionsabnahme pro Minute

f = Verdünnungsfaktor der Probe

#### 2. Einsatz von PDC-W392A zur PAC-Synthese

Die Gewinnung chiraler Acyloine kann ausgehend von einer α-Ketocarbonsäure bzw. einem Aldehyd als Substrat und einem weiteren Aldehyd als Cosubstrat mittels PDC oder PDC-Mutanten erfolgen.

Beispielhaft seien die folgenden Anwendungen genannt:

##### PAC-Synthese ausgehend von Pyruvat und Benzaldehyd

Der Syntheseansatz enthielt 40 mM Pyruvat, 70 mM Benzaldehyd und 10 U/ml PDC-W392A in Mes/KOH-Puffer, 50 mM, pH 6,5, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,5 mM ThDP. Die Reaktion wurde eine Stunde bei 37°C durchgeführt und das entstandene PAC (6,2 mM) mittels HPLC detektiert.

## PAC-Synthese ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd

Der Syntheseansatz enthielt anstelle von Pyruvat 40 mM Acetaldehyd. Ansonsten wurde wie oben beschriebenen verfahren. Nach einer Stunde waren 3.7 mM PAC entstanden.

## PAC-Synthese mit PDC-W392A im gekoppelten 3-Enzymsystem

Die enzymatische Umsetzung erfolgte gemäß Fig. 3. Der Einsatz der Alkohol-dehydrogenase (ADH) aus Hefe (E.C. 1.1.1.1) ermöglicht die kontinuierliche Entfernung von Acetaldehyd und die dadurch bedingte Inaktivierung der PDC-W392A. Die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* (E.C. 1.2.1.2) dient zur Regeneration von NADH. Die enzymatische PAC-Synthese wurde in 20 ml Mes/KOH-Puffer, 50 mM, pH 6.5, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5 mM ThDP, durchgeführt. Der Ansatz enthielt:  
1.3 U/ml PDC-W392A, 2 U/ml ADH, 2.5 U/ml FDH. Die anfängliche Pyruvatkonzentration betrug 70 mM. Ferner enthielt der Ansatz 2 mM NADH und 200 mM Formiat. Nach 120 min. wurden erneut 0.7 ml einer 2.1 M Pyruvatlösung und 0.125 ml einer 8 M Natriumformiatlösung zugegeben. Die durch die enzymatische Umsetzung resultierende pH-Erhöhung wurde mit Ameisensäure gegentitriert. Nach 7 Stunden waren 6.8 mM PAC entstanden.

## Aufarbeitung und Analytik der enzymatischen Reaktionsprodukte

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte mittels präparativer reversed-phase HPLC. Als stationäre Phase wurde eine C8-MOS Hypersil-Säule, 250 • 4.6 mm, verwendet. Die Elution erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit Essigsäure/Acetonitril 0.5%/12.5% (v/v) mit einer Flußrate von 1.5 ml/min. Die Elutionszeiten betrugen unter diesen Bedingungen: PAC, 4.77 min. und 2-Hydroxypropiophenon, 541 min. Die Zuordnung des entstandenen Enantiomeren als R-(–)-PAC erfolgte mittels Polarimetrie anhand eines Standards aus der PAC-Produktion (Knoll AG).

Das Enantiomerenverhältnis von PAC wurde mittels chiraler Gaschromatographie zu >98% bestimmt.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung einer zur Bildung von (R)-(–)-Phenylacetylcarbinol (I) in  $\geq 95\%$  Enantiomerenreinheit mit einem Produktverhältnis von I zu 2-Hydroxypropiophenon von  $\geq 95\%$  befähigten Pyruvat-decarboxylase (PDC) mit einer spezifischen Aktivität bzgl. der Phenylacetylcarbinolbildung von  $\geq 1$  U/mg durch Isolierung aus einem Produzenten-Organismus, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Produzenten-Organismus mit einem für PDC kodierenden Gen aus *Zymomonas mobilis* verwendet, in dessen DNA-Sequenz das für den Tryptophanrest kodierende Kodon TGG an der Position 1174–1176 durch ein Kodon ersetzt ist, das für einen Aminosäurerest mit verminderter Raumerfüllung kodiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Kodon TGG durch ein Kodon ersetzt ist, das für einen einfachen, insbesondere aliphatischen Aminosäurerest kodiert.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Kodon TGG durch ein Kodon ersetzt ist, das für einen Alaninrest kodiert.
4. Pyruvat-decarboxylase befähigt zur Umwandlung von Pyruvat in Gegenwart von Benzaldehyd in (R)-(–)-Phenylacetylcarbinol in  $\geq 95\%$  Enantiomerenreinheit mit einem Produktverhältnis von I zu 2-Hydroxypropiophenon von  $\geq 95\%$  mit einer spezifischen Aktivität bzgl. der Produktbildung von  $\geq 1$  U/mg, erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 3, deren Tryptophanrest in Position 392 durch einen Aminosäurerest minderer Größe ersetzt ist.
5. Pyruvat-decarboxylase nach Anspruch 4, gekennzeichnet durch einen den Tryptophanrest an der Position 392 ersetzenden Alaninrest.
6. Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Acyloinen durch enzymatische Acyloinkondensation von  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren und/oder Aldehyden in Gegenwart von PDC, dadurch gekennzeichnet, daß man als PDC ein Enzym nach Anspruch 4 oder 5 verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Acyloinkondensation ausgehend von  $\alpha$ -Ketocarbonsäure unter gleichzeitiger Reduktion von überschüssigem durch Decarboxylierung gebildeten Aldehyd mittels Alkohol-dehydrogenase und NADH durchführt, das vorzugsweise in situ durch Formiat-dehydrogenase regeneriert wird.
8. DNA-Sequenz des PDC-Gens von *Zymomonas mobilis*, gekennzeichnet durch ein für einen Aminosäurerest minderer Größe kodierendes Kodon an der Position 1174–1176.
9. DNA-Sequenz nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch ein für einen Rest einer aliphatischen Aminosäure, insbesondere für einen Alaninrest, kodierendes Kodon an der Position 1174–1176.
10. DNA-Sequenz des Gens für thiamindiphosphat-abhängiges Enzym mit einer Zugangslimitierung im zum aktiven Zentrum führenden Substratkanal dadurch gekennzeichnet, daß an der Stelle des für die Zugangslimitierung kodierenden Kodons ein Kodon eingeführt ist, das für einen die Zugangslimitierung beseitigenden Aminosäurerest kodiert.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

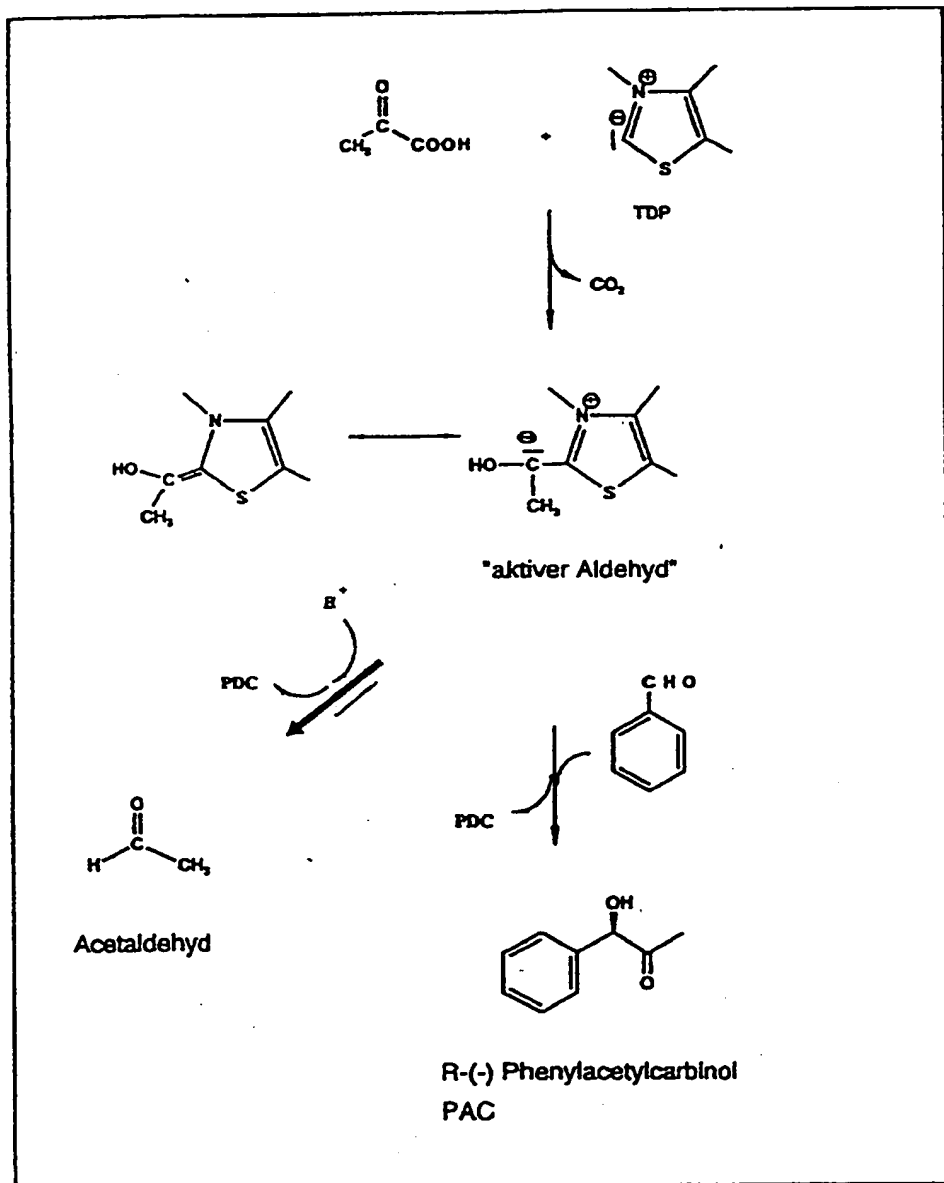
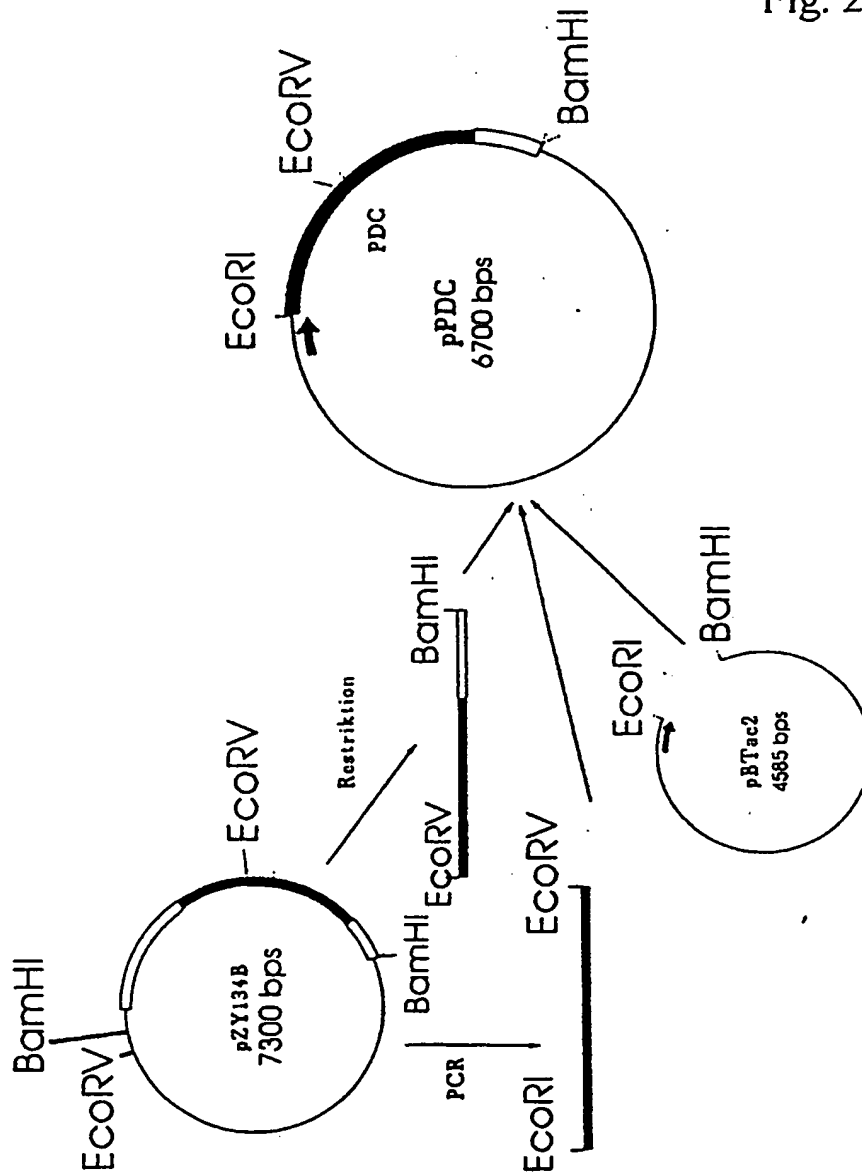


Fig. 1



Fig. 2



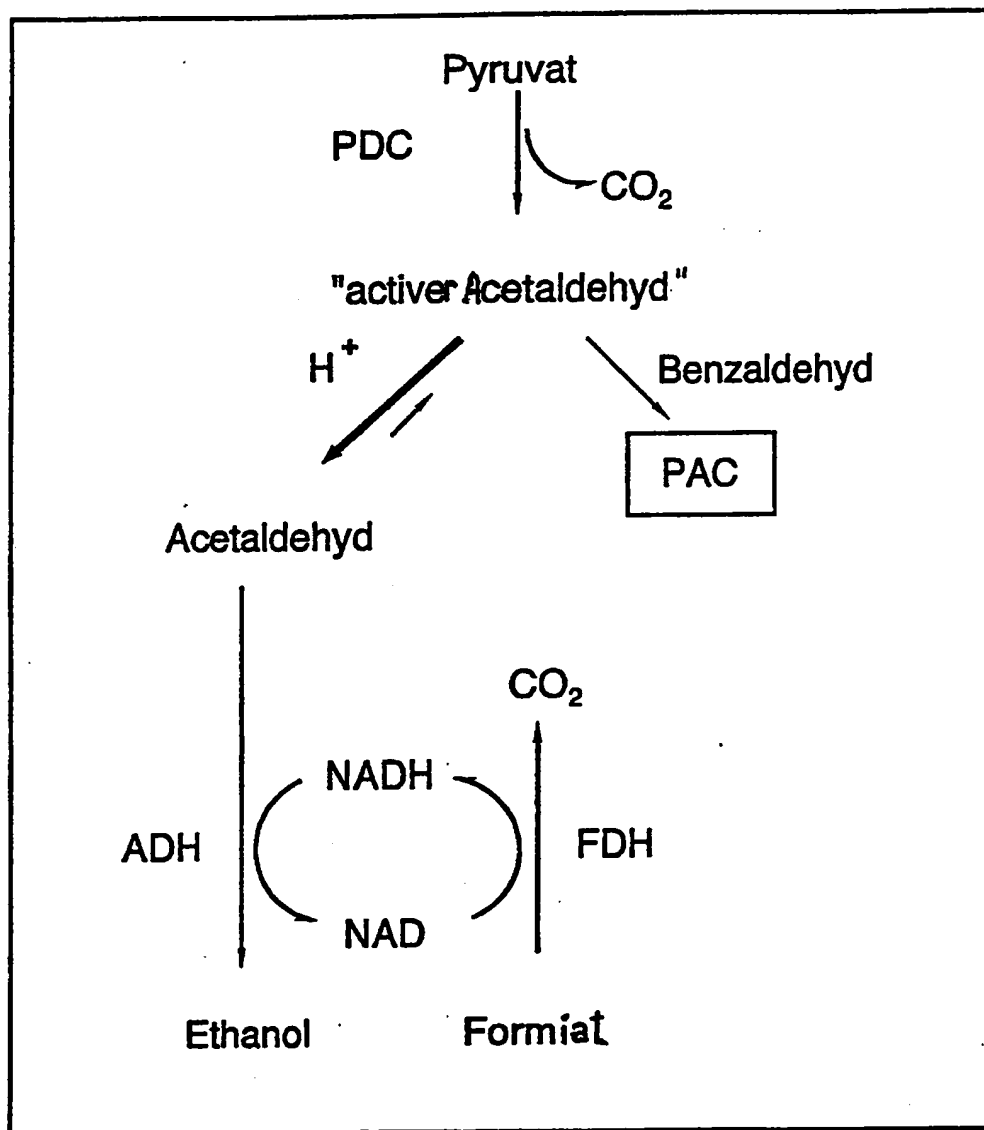


Fig. 3

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**